

Marisa Calado Silva Santos

MicroRNAs: mediadores moleculares da senescência e do envelhecimento



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2016

Marisa Calado Silva Santos

MicroRNAs: mediadores moleculares da senescência e do envelhecimento



Universidade Fernando Pessoa

Faculdade de Ciências da Saúde

Porto, 2016

MicroRNAs: mediadores moleculares da senescência e do envelhecimento

Marisa Calado Silva Santos

Projeto de Pós-Graduação apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professora Doutora Maria Gil Roseira Ribeiro

MicroRNAs: mediadores moleculares da senescência e do envelhecimento

Resumo

Os microRNAs (miRNAs) são curtas cadeias de RNA não codificante, com cerca de 18 a 25 nucleotídeos, que regulam os níveis de mRNAs que são produzidos a partir de genes codificantes de proteínas. A descoberta dos miRNAs e a sua subsequente caracterização estrutural e funcional revelou a existência de um novo processo de regulação pós-transcricional da expressão génica em células eucarióticas que afeta uma grande variedade de funções celulares. A senescência acompanha o processo de envelhecimento dos organismos e é manifestada pela perda da capacidade proliferativa das células em resposta a diversos factores de *stress* que desencadeiam alterações moleculares específicas. Na última década foram identificados e caracterizados vários miRNAs que participam na regulação do fenótipo da senescência celular, quer através da modulação de vias de sinalização endógenas que controlam a progressão do ciclo celular, quer através da secreção de factores de sinalização. Vários estudos têm também revelado a enorme potencialidade dos miRNAs como biomarcadores e alvos moleculares de novas abordagens terapêuticas. No futuro, é expectável que os avanços científicos possam ser transferidos para a prática clínica com vista a uma efetiva prevenção, vigilância e tratamento do envelhecimento prematuro e de doenças associadas ao envelhecimento.

Palavras-chave: RNA não codificante, microRNA, senescência e envelhecimento.

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding strands of RNA, of about 18 to 25 nucleotides, which regulate the level of mRNAs that are produced from protein-coding genes. The discovery of miRNAs and its subsequent structural and functional characterisation revealed a new process of post-transcriptional regulation of gene expression in eukaryotic cells which affect a wide variety of cellular functions. The senescence go along with the aging process observed in organisms, being expressed by the loss of the cell proliferative ability in response to several stress factors that trigger specific molecular alterations. In the last decade, several miRNAs with regulatory roles in the cellular senescence phenotype through their action in endogenous signalling pathways involved in the control the cell cycle progression or in the secretion of signalling factors have been identified and characterized. Several studies have also unraveled the tremendous potentiality of miRNAs as biomarkers and molecular targets of new therapeutic approaches. In the future, all these scientific advances are expected to be translated into clinical practice for an effective prevention, surveillance and treatment of premature aging and aging-associated diseases.

Keywords: Noncoding RNA, microRNA, senescence and aging.

Agradecimentos

Desejo exprimir os meus sinceros agradecimentos a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho:

À minha Orientadora Professora Doutora Maria Gil Roseira Ribeiro, por todo o acompanhamento, conhecimento científico, confiança e motivação transmitida ao longo deste período.

Ao meu esposo pela paciência, disponibilidade, carinho, amizade quer nos melhores quer nos piores momentos.

Aos meus pais e à minha irmã por todo o apoio e confiança depositada.

A todos os que me rodeiam, pelo carinho, confiança, apoio incondicional e paciência infinita.

	Página
Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iii
Índice de figuras	v
Índice de tabelas	vi
Abreviaturas	vii
1. Introdução	1
2. Aspectos básicos da expressão génica em eucariotas	4
3. Caracterização estrutural e funcional dos miRNAs	5
3.1. Transcrição, processamento nuclear e exportação	5
3.2. Processamento citoplasmático, maturação e <i>turnover</i>	6
3.3. Função celular	9
3.4. Mecanismos moleculares de ação	10
4. Biologia do envelhecimento	14
4.1. Senescência celular	16
4.2. <i>Stress</i> oxidativo e produção de ROS	19
4.3. Mutações na molécula de DNA	20
4.4. Encurtamento dos telómeros	20
5. Senescência e miRNAs	22
6. Potencialidades terapêuticas dos miRNAs	26
7. Os miRNAs como biomarcadores moleculares	28
8. Conclusão e perspetivas futuras	30
9. Bibliografia	32

Índice de figuras

	Página
Figura 1. O nemátodo <i>Caenorhabditis elegans</i> .	2
Figura 2. Representação esquemática da biogénese dos miRNAs.	7
Figura 3. Análise comparativa da produção de miRNAs e siRNAs.	12
Figura 4. Alterações moleculares associadas ao processo de envelhecimento.	17
Figura 5. MicroRNAs promotores ou inibidores da senescência celular.	25
Figura 6. Regulação da função de miRNAs <i>in vivo</i> baseada na aplicação da tecnologia do RNA interferente.	26

Índice de tabelas

	Página
Tabela 1. Classificação de algumas teorias biológicas do envelhecimento.	15

Abreviaturas

Ago - Proteína Argonauta

DGCR8 - *DiGeorge syndrome critical region gene 8*

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

Drosha - Endonuclease da família da RNase III

dsRNA – RNA de cadeia dupla

E2F - Fator de transcrição

IL - Interleucina

miRNAs - MicroRNAs

mRNA - RNA mensageiro

NO - Óxido nítrico

p - Proteína

pRb - Proteína retinoblastoma

Pri-miRNA - miRNA primário

RISC- Complexo indutor do silenciamento do RNA

RNA - Ácido ribonucleico

ROS - Radicais livres de oxigênio

SA- β -Gal - β -galactosidase associada à senescência

SASP - Secreção associada à senescência

siRNAs – Pequenos RNAs interferentes

tRNA - RNA de transferência

UTR – Região não traduzida

1. Introdução

“...não existe uma entrada na velhice, mas entradas diferentes e sucessivas”

Levet-Gautrat

O envelhecimento cronológico é um processo que se inicia no nascimento e continua até à morte. Ele resulta de alterações celulares específicas que se manifestam em todos os tecidos e órgãos, comprometendo as funções fisiológicas do organismo que fica, por isso, mais predisposto a doenças crónicas (Teixeira e Guariento, 2010).

Os estudos científicos sobre as causas do envelhecimento humano são limitados. Por questões éticas, as pesquisas experimentais em seres humanos são limitadas sendo, por isso, desenvolvidas preferencialmente em modelos animais, nomeadamente, os roedores. Também são utilizados organismos-modelo, tais como o nematoide *Caenorhabditis elegans*, a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A vida curta, o genoma completamente sequenciado, a biologia bem caracterizada e o custo associado à sua utilização em estudos experimentais são características que favorecem a sua utilização destes organismos em estudos de investigação (Teixeira e Guariento, 2010).

Os microRNAs (miRNAs) representam a classe de moléculas de RNA não codificantes mais bem caracterizada. Com cerca de 18-25 nucleotídeos, estas moléculas têm por alvo o RNA mensageiro (mRNA) inibindo a sua tradução e, subsequentemente, a síntese da respetiva proteína. Sendo reguladores pós-transcricionais da expressão génica, estas pequenas moléculas de RNA influenciam muitos e variados processos celulares que vão desde a embriogénese à apoptose. Por isso, os miRNAs são a nova frente de pesquisa de muitos cientistas que procuram conhecer melhor os mecanismos de modulação da expressão génica, na saúde e na doença.

Os miRNAs permaneceram despercebidos até à década de 90, não só por falta de métodos sensíveis à sua deteção, mas também por se assumir que o DNA não codificante não seria funcional. De facto, até ao início da década de 90, o interesse da comunidade científica estava essencialmente focado na identificação e caracterização de genes codificantes,

bem como na compreensão dos mecanismos da transcrição e tradução, e o estudo das regiões não codificantes do genoma não despertava muito interesse. Só em 1993 a importância dos miRNAs começou a ser revelada.

Apesar do termo miRNA ter surgido em 2001, o primeiro miRNA foi descoberto em 1993 quando o investigador Victor Ambros e colaboradores estudavam a influência de uma mutação no desenvolvimento da *Caenorhabditis elegans* (Figura 1), tendo demonstrando que o gene mutado *lin-4* não codificava uma proteína, mas era expresso na forma de um RNA minúsculo que se ligava especificamente a um mRNA, bloqueando a tradução da proteína. Subsequentemente, muitos outros miRNAs foram identificados neste organismo.

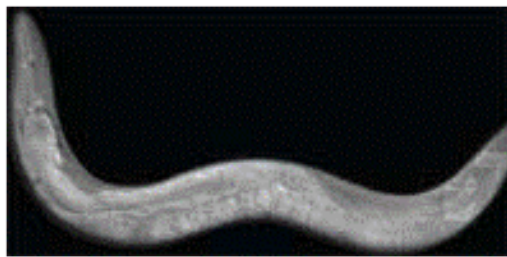


Figura 1. O nemátodo *Caenorhabditis elegans* (extraído de <http://nematode.net>).

A partir de 1998, com a descoberta do mecanismo celular designado por interferência de RNA ou simplesmente RNAi, por Andrew Fire e Craig Mello a quem foi atribuído o Nobel de Medicina em 2006, foi despertado o interesse por estas pequenas moléculas de RNA reguladoras da expressão génica. O segundo miRNA foi descoberto em 2000 em *C. elegans*, o *let-7*, que reprime a expressão de, pelo menos, cinco proteínas (*lin-41*, *lin-14*, *lin-28* e *daf-12*) envolvidas na transição entre diferentes fases do desenvolvimento deste nemátodo. Subsequentemente, novos estudos demonstraram que esta sequência génica é conservada em muitas espécies, não deixando dúvidas de que estes deveriam desempenhar um papel fisiológico importante. Presentemente, mais de 1 000 miRNAs humanos estão descritos no repositório público de sequências de miRNA, a miRBase (Kozomara e Griffiths-Jones, 2014). Os estudos nesta área têm revelado que diferentes

tipos de miRNA são expressos em diferentes tipos de células e em diferentes fases do desenvolvimento dos organismos bem como em condições patológicas de etiologia muito diversa o que revela, por um lado, a enorme complexidade desta nova forma de regulação da expressão génica, como também sugere a sua utilização a nível terapêutico (Almeida *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2012; Smith Vikos e Slack, 2012). A informação sobre os RNAs não codificantes tem, por isso, registado um crescimento exponencial nas últimas décadas, nomeadamente quanto ao seu papel de mediador molecular nos processos de senescência celular e envelhecimento.

Neste contexto, foi efetuada uma revisão bibliográfica acerca destas pequenas moléculas de RNA, quer a nível da sua estrutura, função e mecanismo de ação, bem como do seu envolvimento no processo de envelhecimento. Deste modo, o presente trabalho corresponde a uma dissertação de índole teórica, estando isenta de qualquer tipo de trabalho prático experimental. Em termos metodológicos, procedeu-se à pesquisa de artigos científicos, num período compreendido entre os meses de setembro de 2015 e abril de 2016, em bases de dados como PubMed, Science Direct e b-On. A escolha destas bases de dados para a realização da pesquisa bibliográfica prende-se com o facto de serem as bases que, em regra, compilam o maior número de artigos científicos recentemente publicados na área da saúde. Quanto aos critérios usados na seleção dos artigos científicos, a pesquisa foi limitada a trabalhos escritos em inglês, português ou espanhol, com data de publicação entre 2006 e 2015, ou de ano anteriores no caso de o seu conteúdo ser considerado relevante para a escrita desta tese.

2. Aspectos básicos da expressão génica em eucariotas

A expressão génica em eucariotas é constituída por um número de etapas interligadas desde a transcrição do material genético até à síntese proteica, sendo os RNAs mensageiros (mRNAs) os intermediários chave deste processo. A informação genética armazenada nas moléculas de DNA na forma de genes é transcrita para uma molécula intermédia chamada de precursor do mRNA (pré-mRNA) através de um mecanismo conhecido como transcrição. Durante este processo o pré-mRNA é submetido a um processamento de maturação através da remoção de intrões (*splicing*), adição da estrutura *cap* na região 5' do transcrito e adição da cauda poliadenilada na região 3', dando origem ao mRNA. Uma vez processado, o mRNA é exportado para o citoplasma onde é traduzido em proteína e finalmente degradado. As diferentes etapas desta via de expressão génica podem ser alvos de regulação génica (Behm-Ansmant *et al.*, 2007).

Apesar da complexidade da expressão génica em eucariotas permitir controlar o nível de produção de uma proteína, ela também faz com que este processo seja passível de erros que poderão acontecer em qualquer uma das etapas da expressão génica. Contudo, as células eucariotas desenvolveram mecanismos de controlo de qualidade do mRNA que garantem a fidelidade da expressão génica através da deteção e degradação de transcritos anómalos por ação de nucleases. Estes mecanismos de controlo, também denominados de vigilância, atuam quer no núcleo quer no citoplasma das células. Por exemplo, os mRNAs incorretamente processados, antes de serem exportados para o citoplasma, são degradados por mecanismos de vigilância do mRNA no núcleo. No citoplasma, existem também mecanismos específicos de controlo de qualidade que degradam mRNAs que contenham codões de terminação da tradução prematuros, tRNAs com modificações incorretas, RNAs ribossomais com defeitos funcionais, etc. Estes mecanismos de controlo de qualidade da maquinaria da tradução são muito importantes para evitar a acumulação de proporções de proteínas aberrantes que podem ser potencialmente letais para a célula (Behm-Ansmant *et al.*, 2007; Fabian *et al.*, 2010)

3. Caracterização estrutural e funcional dos miRNAs

Os miRNA são cadeias curtas de RNA não codificante presentes em plantas e animais, e cuja função é o silenciamento do mRNA. Por isso, estas moléculas estão tipicamente envolvidas na regulação pós-transcricional da expressão génica, bem como na proteção da célula eucariótica contra vírus de RNA (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Mais recentemente foi descrito em procariotas um mecanismo de silenciamento semelhante ao de eucariotas, embora com outros constituintes moleculares, que visam a proteção das bactérias contra bacteriófagos (van der Oost, 2009). Contudo, ele não será abordado no âmbito do presente trabalho.

3.1. Transcrição, processamento nuclear e exportação

Os miRNAs são produzidos a partir de genes nucleares individualizados, geralmente intergénicos, embora uma menor proporção possa derivar de segmentos intrónicos de genes codificantes (Rodríguez *et al.*, 2004).

A biogénese do miRNA está esquematizada na Figura 2. Inicialmente ocorre a transcrição do gene respetivo pela RNA polimerase II (Lee *et al.*, 2004) e a formação de um transcrito de miRNA primário (pri-miRNA) modificados nas extremidades, 5' - *cap* e 3' - poli(A). O pri-miRNA apresenta uma estrutura *hairpin* (compreende uma haste e um laço), com cerca de 70 nucleotídeos, que é clivada no núcleo pelo complexo Microprocessador formado por Drosha (endonuclease da família da RNase III) e pelo seu cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*, ou *Pasha* nos invertebrados), gerando uma molécula precursora do miRNA maduro designada por pré-miRNA (Bartel, 2004; Grillari e Grillari-Voglauer, 2010; Lee *et al.*, 2003; Smith-Vikos e Slack, 2012).

O pré-miRNA também pode ser originado a partir de pequenos intrões (designados por mirtrões) libertados pelo spliceossoma e, neste caso, a sua integração na via da biogénese de miRNA é independente do complexo Microprocessador (Grillari e Grillari-Voglauer,

2010; Meister, 2013). Os mirtrões, inicialmente descritos em *C. elegans* e na *D. melanogaster*, também são observados em mamíferos (Berezikov *et al.*, 2007).

O pré- miRNA é geralmente transportado para o citoplasma pela exportina-5 que utiliza Ran-GTP como co-fator (Almeida *et al.*, 2011, Lund *et al.*, 2004), embora algumas moléculas de miRNAs exibam uma localização essencialmente nuclear (Hwang *et al.*, 2007).

3.2. Processamento citoplasmático, maturação e turnover

No citoplasma, o pré-miRNA é transformado em miRNA de cadeia dupla linear (dsRNA), com 20-25 nucleotídeos. Este processamento é efetuado pela enzima Dicer, também pertencente à família de endonucleases RNase III, que cliva o *haiprin*. Uma das cadeias de dsRNA (miRNA), com 21-23 nucleotídeos, é incorporada no complexo multimérico ribonucleoproteico de silenciamento denominado RISC (*RNA-induced silence complex*), cujos principais componentes são as proteínas argonautas (Ago), nomeadamente a argo-2 que liga o miRNA humano e atua simultaneamente como RNase e como centro catalítico de RISC, Dicer (Dcr, RNase III envolvida na formação de dsRNA a partir do qual se forma o miRNA) e TRBP (*HIV transactivating response RNA-binding protein*, proteína com 3 domínios de ligação a dsRNA) (Bartel, 2004; Grillari e Grillari-Voglauer, 2010; Smith-Vikos e Slack, 2012). A cadeia que permanece no complexo RISC é selecionada com base na estabilidade da extremidade 5' do dsRNA. A cadeia que se revelar termodinamicamente menos estável permanece no complexo, enquanto que a cadeia mais estável é clivada e degradada por uma proteína argonauta. Uma vez que o emparelhamento entre miRNA e o mRNA alvo ocorre segundo a regra de complementaridade, a seletividade do complexo RISC quanto à molécula de mRNA que é silenciada irá ser determinada pela sequência da cadeia de dsRNA que permanece no complexo (Grillari e Grillari-Voglauer, 2010).

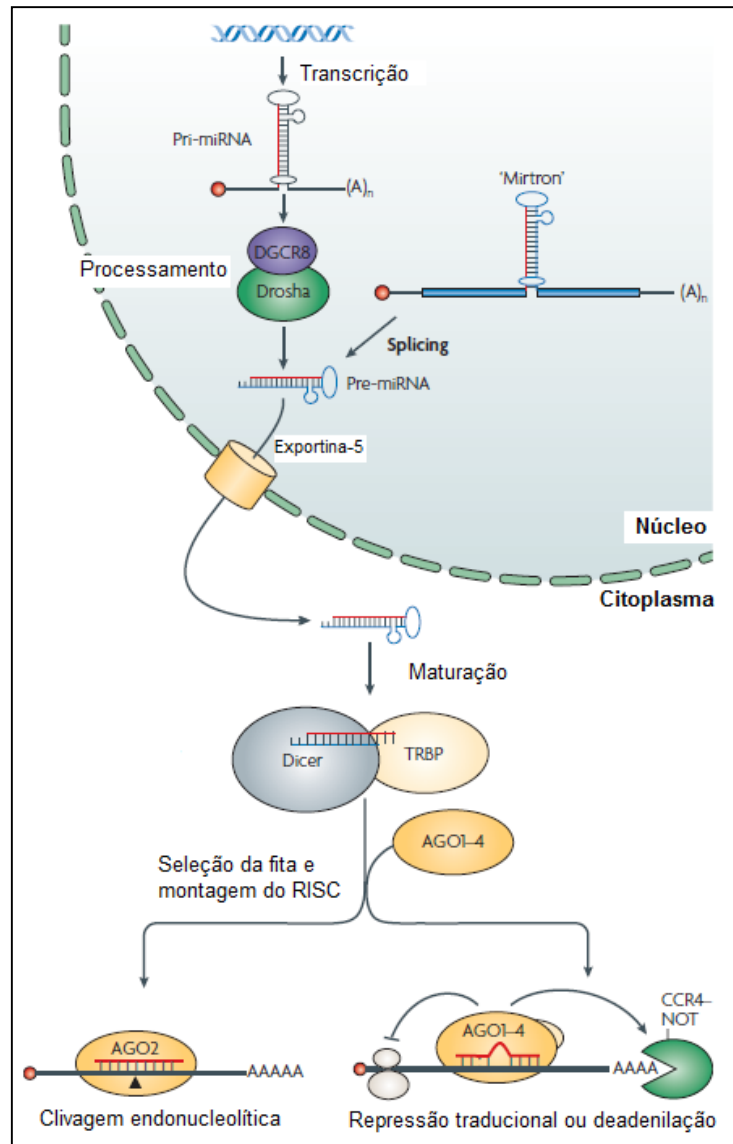


Figura 2. Representação esquemática da biogénese dos miRNAs. Os genes dos miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II em transcritos primários de miRNAs (pri-miRNA) que são processados inicialmente no núcleo pelo complexo Drosha e DGCR8, dando origem aos miRNAs precursores (pre-miRNAs). Os pre-miRNAs são reconhecidos pela exportina-5 e exportados para o citoplasma (segunda etapa de processamento). A clivagem pela enzima Dicer gera pequenos RNAs de cadeia dupla que são reconhecidos pela proteína Ago e convertidos em cadeia simples. A proteína Ago é responsável por direccionar o miRNA até ao mRNA alvo. Os miRNAs podem induzir o bloqueio da tradução ou recrutar elementos que levam a degradação do mRNA, dependendo do grau de complementaridade entre as duas moléculas. (Figura extraída de Filipowicz *et al.*, 2008).

Na célula, o *turnover* do RNA ocorre em corpos de processamento citoplasmáticos (*P-bodies*) que são compartimentos que concentram proteínas envolvidas na degradação do mRNA, na repressão da tradução e no silenciamento da expressão gênica mediado por RNA, e incluem RNAs reguladores, bem como moléculas de RNA que não estão a ser usadas na tradução. Os *P-bodies* são responsáveis pela integração da informação biomolecular e pela decisão quanto ao destino dessas moléculas de mRNA, isto é, tradução, silenciamento ou degradação programada (Eulalio *et al.*, 2007; Rossi, 2005). Estes compartimentos citoplasmáticos discretos foram originalmente descritos por Sheth e Park, em 2003, como sendo o local onde eram acumulados os RNAs de levedura que não eram considerados aptos para tradução porque, por exemplo, apresentavam caudas poli(A) encurtadas, tendo sido, por isso, nomeados *P-bodies*. No caso dos miRNAs, proteínas argonautas pode influenciar a seleção da cadeia que irá atuar como miRNA, nomeadamente selecionar miRNAs que reconhecem uma maior diversidade de mRNAs, estabilizando-os em detrimento da cadeia oposta que, reconhecendo um menor número de mRNAs é, por isso, preferencialmente degradada. Este processo de decisão e o subsequente tempo de semi-vida dos miRNAs ocorre através do recrutamento de componentes dos *P-bodies* para o mRNA alvo (Grillari e Grillari-Voglauer, 2010).

Relativamente à degradação enzimática dos miRNAs, foram já identificadas algumas exoribonucleases, nomeadamente 5'→3' XRN2 (também designada RAT1) em *C. elegans* (Grillari e Grillari-Voglauer, 2010).

Em conclusão, um complexo mecanismo que envolve não só a biogénese mas também o *turnover* de miRNAs, e que funciona de forma articulada com outros fatores, quer endógenos quer exógenos, é responsável pelo padrão de miRNAs maduros que são produzidos e, subsequentemente, pelos grupos de genes cuja expressão é pós-transcricionalmente regulada (Vikos e Slack, 2012).

3.3. Função celular

A principal função dos miRNAs é inibir a expressão pós-transcricional de genes codificantes, quer através da inibição da tradução quer através da degradação do mRNA. A inibição da tradução (sem alteração dos níveis do mRNA alvo) exerce uma influência modesta na repressão da tradução, enquanto que a desestabilização do mRNA alvo e a sua subsequente degradação interfere com o nível de mRNA disponível para a tradução (Guo *et al.*, 2010). No entanto, alguns miRNAs também podem ativar a tradução de mRNAs, por exemplo por interação com o promotor de genes codificantes, e a alternância repressão/ativação ser coordenada com o ciclo celular (Vasudevan *et al.*, 2007).

Mais de 1000 miRNAs humanos foram já validados e, individualmente, cada miRNA tem a potencialidade de regular 10 a 100 ou, até mais, transcritos, estimando-se que mais de 30% dos transcritos humanos sejam suscetíveis de regulação por miRNA (Bentwich *et al.*, 2005; Friedman *et al.*, 2009; Lewis *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2005; *Homo sapiens* miRNAs na miRBase; Thomson *et al.*, 2011). Esta característica permite a regulação dos níveis intracelulares de múltiplos componentes de uma única via de sinalização ou a regulação simultânea de vias celulares interrelacionadas (Koturbash *et al.*, 2011; Thomson *et al.*, 2011). Para além disso, a sua frequente organização em *clusters* genómicos que coexpressam diferentes miRNAs exponencia os efeitos fisiológicos decorrentes da ação destas moléculas reguladoras que participam em praticamente todos os processos celulares, incluindo embriogénese e desenvolvimento, proliferação, diferenciação, migração, apoptose, senescência e autofagia (Ambros, 2004; Grillari e Grillari-Voglauer, 2010; Liu *et al.*, 2012). Deste modo, desequilíbrios neste complexo mecanismo de regulação pós-transcricional da expressão génica poderão interferir com a longevidade de um organismo e/ou originar o aparecimento de diferentes patologias. De facto, a produção de miRNA específicos tem sido implicada no cancro, doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e doenças neurodegenerativas (Almeida *et al.*, 2011). Para além disso, em *loci* codificantes de miRNAs foram identificados polimorfismos de nucleótido único, vulgarmente conhecidos por SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) e translocações, e a sua presença associada a várias doenças (Grillari e Grillari-Voglauer, 2010). No âmbito do presente trabalho apenas irá ser focada a

associação dos miRNAs com a senescência celular e, subsequentemente, com o envelhecimento.

3.4. Mecanismos moleculares de ação

Resultados experimentais e de modulação computacional sugerem a existência de 9 mecanismos de ação do miRNA: inibição da associação Cap-subunidade 40S, inibição da associação da subunidade 60S a 40S-AUG, inibição da elongação, terminação prematura por dissociação das subunidades do ribossoma, degradação cotranslacional da proteína nascente, retenção de miRNA, mRNA e complexo RISC em corpos de processamento citoplasmáticos, desestabilização e degradação do mRNA, clivagem e degradação do mRNA, e reorganização da cromatina mediada por miRNA seguida de silenciamento da transcrição (Morozova *et al.*, 2012).

No entanto, o mecanismo de ação principal assenta no emparelhamento perfeito ou imperfeito entre as extremidades do miRNA e do mRNA alvo. O miRNA maduro pode inibir a tradução através do emparelhamento imperfeito com a extremidade 3'-UTR do mRNA alvo ou impedir a tradução através do emparelhamento perfeito com a extremidade 3'-UTR ou com regiões codificantes do mRNA alvo (Figura 2). Este segundo mecanismo é geralmente observado em plantas e induz a clivagem e degradação do mRNA alvo. O emparelhamento imperfeito com o mRNA é o mecanismo principal de ação dos miRNAs em animais, incluindo mamíferos. No entanto, estudos *in vitro*, *in vivo* e *in silico* sugerem que a ligação do miRNA também pode ser estabelecida com a extremidade 5'-UTR do mRNA alvo, tendo neste caso tendência para potenciar, em vez de reprimir, a sua tradução (Bartel *et al.*, 2009; Filipowicz *et al.*, 2008; Lytle *et al.*, 2007; Grillari e Grillari-Voglauer, 2010; Moretti *et al.*, 2010; Sacco e Masotti, 2012; Sevignani *et al.*, 2006).

Apesar do(s) mecanismo(s) moleculares de silenciamento da expressão, quer por repressão da tradução ou degradação do transcrito, não estar, ainda, bem estabelecido é possível que dependa de vários fatores, provavelmente não mutuamente exclusivos, tais

como o grau de imperfeição do emparelhamento, tipo e fase celulares e aspetos intrínsecos ao mRNA alvo. Pelo facto do silenciamento da expressão por repressão da tradução em células animais estar especialmente dependente de um emparelhamento imperfeito que geralmente abrange uma pequena região de apenas 6-8 nucleótidos na extremidade 5' do miRNA (grau de emparelhamento insuficiente para induzir a degradação do mRNA alvo), uma única molécula de miRNA poderá reconhecer várias moléculas de mRNA e, subsequentemente, regular de forma coordenada vários processos celulares funcionalmente relacionados e de forma concertada com os fatores de transcrição (Grillari e Grillari-Voglauer, 2010), bem como um mRNA alvo pode ser regulado por vários miRNAs (Friedman *et al.*, 2009; Krek *et al.*, 2005). No entanto, genes envolvidos em funções celulares conservadas têm, geralmente, poucos locais de reconhecimento de miRNAs (Lewis *et al.*, 2003). Atualmente existem diversas ferramentas bioinformáticas que permitem a identificação de potenciais moléculas de mRNA alvo de miRNAs (Almeida *et al.*, 2011). A sua utilização juntamente com abordagens experimentais representará, no futuro, um importante contributo para a clarificação da complexa rede funcional de miRNAs e dos seus mecanismos de ação.

Uma das abordagens experimentais frequentemente utilizada na inativação pós-transcricional da expressão génica consiste na utilização de moléculas de RNA interferentes ou siRNAs (*small interfering RNA*). Estas pequenas moléculas de RNA não codificante são estruturalmente semelhantes aos miRNAs, embora produzidos a partir de longas cadeias duplas de RNA por ação da polimerase de RNA dependente de RNA, e usadas em estudos *in vivo* ou *in vitro* para a inativação de sequências génicas específicas. Dependendo do organismo, o siRNA é introduzido, por transfecção, na forma de cadeia dupla curta, e neste caso uma das cadeias é incorporada no complexo RISC e a outra cadeia é degradada; se for introduzido na forma de cadeia dupla longa, o seu processamento ocorre por Dicer (Figura 3). Em muitos organismos foram identificados siRNAs derivados de transcritos endógenos. Em *D. melanogaster* os siRNAs endógenos correspondem essencialmente a retrotransposões ou RNAs com estruturas em forma de *haipin*. Em ovócitos de ratinho, os siRNAs podem ter origem noutros tipos de estruturas, designadamente pseudogenes. Contudo, não é claro se as células somáticas de mamíferos também produzem siRNAs (Meister, 2013). No entanto, a entrada de siRNAs endógenos na via de silenciamento dos miRNAs parece plausível e sugere que, apesar da divergência

a nível da sua biogénese, são funcionalmente convergentes (Grillari e Grillari-Voglauer, 2010).

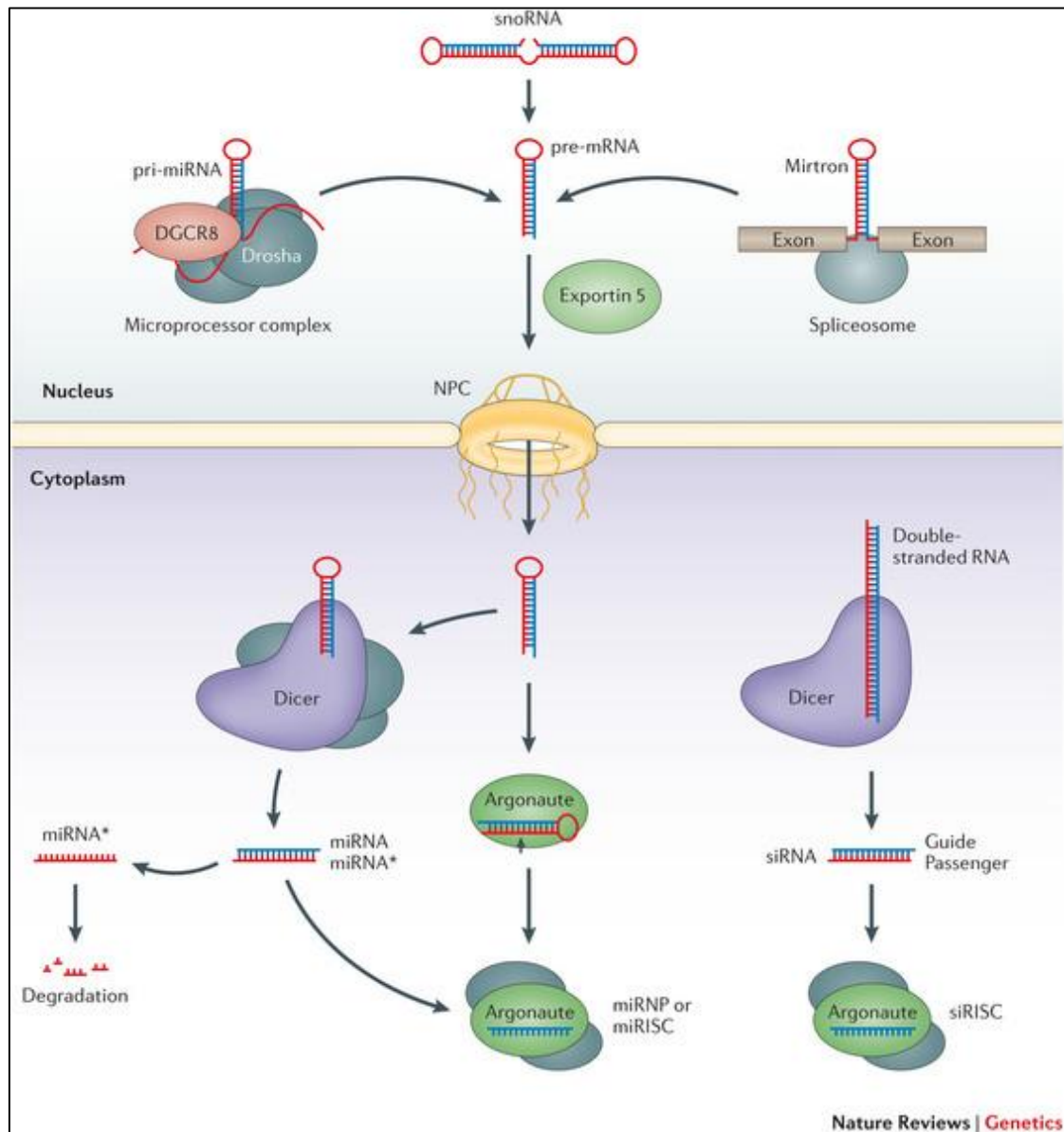


Figura 3. Análise comparativa da produção de miRNAs e siRNAs. O pré-miRNA é exportado para o citoplasma pela exportina-5, onde é clivado pela Dicer, gerando um miRNA maduro com cerca de 22 nucleotídeos de comprimento. As argonautas, proteínas presentes no complexo RISC, ligam-se aos siRNA e miRNA, apresentam atividade de endonuclease dirigida contra a cadeia de mRNA complementar ao siRNA ou miRNA. As proteínas argonautas são também responsáveis pela seleção da cadeia do siRNA que será incorporada ao RISC. O complexo RISC permite o emparelhamento entre a cadeia do miRNA incorporada e a região homóloga do mRNA-alvo por complementariedade de bases. Normalmente, quando a

complementariedade é total, ocorre degradação do mRNA e, quando é parcial, ocorre repressão da tradução e posterior degradação do mRNA (Figura extraída de Meister, 2013).

4. Biologia do envelhecimento

O envelhecimento é um processo inerente à vida, e tem um interesse especial para a população humana devido à crescente incidência de patologias crônicas associadas à idade, tais como, a diabetes, as doenças neurológicas, as doenças cardiovasculares e o cancro. Por isso, este tema tem sido o objeto de estudo de diversos trabalhos científicos ao longo dos anos, nomeadamente porque a compreensão adequada das bases moleculares e celulares do envelhecimento poderá contribuir para prevenir ou atenuar estas alterações relacionadas com a idade e, desse modo, proporcionar uma maior qualidade de vida e longevidade (Marques *et al.*, 2010).

O envelhecimento é também um processo complexo e multifatorial que requer, por isso, um estudo interdisciplinar (Marques *et al.*, 2010). Ao longo do tempo foram elaboradas várias teorias que associam o envelhecimento de um organismo a uma degeneração progressiva da estrutura e da função dos sistemas biomoleculares e celulares. De uma forma geral, estas teorias podem ser classificadas em dois grupos: genético-evolutivas e estocásticas (Tabela 1). As teorias de natureza genético-evolutiva entendem o envelhecimento como o resultado da acumulação de danos somáticos associados a alterações no DNA, enquanto que as teorias de natureza estocástica assumem que genes das células somáticas são inativados por lesões aleatórias causadas essencialmente por fatores ambientais e cuja acumulação com a idade origina a disfunção e a morte das células (Mota *et al.*, 2004). Embora a perda de funcionalidade possa ser recuperada por mecanismos de reparação e regeneração celulares que, desta forma, evitam a morte celular, à medida que estes mecanismos se tornam menos eficientes, as lesões acumulam-se, provocando desequilíbrios internos e, eventualmente, a morte do organismo (Teixeira e Guariento, 2010; Wei *et al.*, 1998). Dado os múltiplos fatores que podem simultaneamente influenciar o envelhecimento, para além do seu efeito individual é, também, importante considerar a inter-relação entre eles. Deste modo, a divisão das teorias biológicas ilustrada na Tabela 1 deverá ser entendida num contexto mais amplo e não apenas como uma explicação isolada do processo de envelhecimento (Teixeira e Guariento, 2010).

Tabela 1. Classificação de algumas teorias biológicas do envelhecimento (Teixeira e Guariento, 2010).

Teorias	Descrição
Evolutivas <ul style="list-style-type: none"> • Acumulação de mutações • Pleiotropia antagonista • Soma descartável 	<p>A seleção natural não tem significado comparativamente com as mutações que afetam a saúde na idade avançada.</p> <p>Os genes da juventude tornam-se deletérios na fase pós-reprodutiva.</p> <p>As células somáticas são mantidas somente para assegurar a reprodução, tornando-se indispensáveis após esse período.</p>
Moleculares – celulares <ul style="list-style-type: none"> • Erro-catastrófico • Mutações somáticas • Senescência celular/telômeros • Radicais livres/DNA • Produtos finais da glicosilação avançada (<i>advanced glycation end-products</i>, AGE) e ligações cruzadas • Morte celular 	<p>Com o envelhecimento, há um declínio na manutenção da expressão genética que resulta da auto-amplificação dos erros na síntese proteica. A acumulação desses erros provoca o “erro catástrofe”.</p> <p>Os danos moleculares acumulam-se principalmente a nível do DNA. O fenótipo do envelhecimento é causado pelo aumento na frequência de células senescentes. A senescência celular pode resultar do encurtamento dos telômeros (senescência replicativa) ou do <i>stress</i> celular.</p> <p>O metabolismo oxidativo produz radicais livres altamente reativos que causam danos nos lípidos, nas proteínas e no DNA mitocondrial.</p> <p>A acumulação dos AGE, nomeadamente, em proteínas da matriz extracelular, tem consequências deletérias e contribui para o envelhecimento.</p> <p>A morte celular programada (apoptose) ocorre na sequência de alterações/instabilidade genómica.</p>
Sistémicas <ul style="list-style-type: none"> • Neuroendócrina • Neuroendócrina-imunológica • Ritmo/velocidade da vida 	<p>Alterações no controlo neuroendócrino da homeostase resultam em mudanças fisiológicas relacionadas à idade.</p> <p>O declínio da função imune associado ao envelhecimento resulta numa maior incidência de doenças autoimunes.</p> <p>Existe um potencial energético para o metabolismo de cada organismo vivo.</p>

4.1. Senescência celular

A senescência é caracterizada pela perda da capacidade proliferativa das células e por alterações morfológicas e fisiológicas específicas. Em 1891, Weismann sugeriu a existência de um potencial limitado para a capacidade de replicação das células somáticas nos animais superiores que limitava o seu tempo de sobrevivência (Rose, 1991). Contudo, só nos anos 70 foi obtida a sua confirmação experimental por Hayflick e colaboradores, com estudos que demonstraram que os fibroblastos humanos normais em cultura têm uma capacidade finita de proliferação celular correspondente a cerca de 50 duplicações. A constatação de que as células somáticas mitóticas dos organismos têm uma capacidade limitada de duplicação programada geneticamente e que interfere com a longevidade da espécie (Hayflick, 1961; Hayflick, 1980) impulsionou a investigação científica na pesquisa de genes responsáveis pelo processo de envelhecimento.

Os estudos de senescência celular são geralmente efetuados em células cultivadas. Os estudos genéticos em humanos, relacionados com o envelhecimento/longevidade são frequentemente desenvolvidos com gémeos para diminuir o número de variáveis relacionadas com o meio ambiente. Num estudo com uma amostra de 600 pares de gémeos dinamarqueses, monozigóticos ou dizigóticos, foi observada uma influência direta da hereditariedade na longevidade em cerca de 30% dos gémeos relacionados, sugerindo que, mesmo nestes casos, fatores ambientais deverão ser os principais responsáveis pela longevidade (McGue *et al.*, 1993).

A senescência pode ser induzida por fatores intrínsecos, que originam o encurtamento dos telómeros (senescência replicativa), ou por fatores extrínsecos que desencadeiam *stress* celular (senescência prematura induzida por *stress* ou, simplesmente, senescência prematura), tais como, a exposição a agentes oxidantes ou radiação ionizante que podem conduzir à produção de radicais livres, danos na molécula do DNA e/ou ativação de oncogenes (Figura 4).

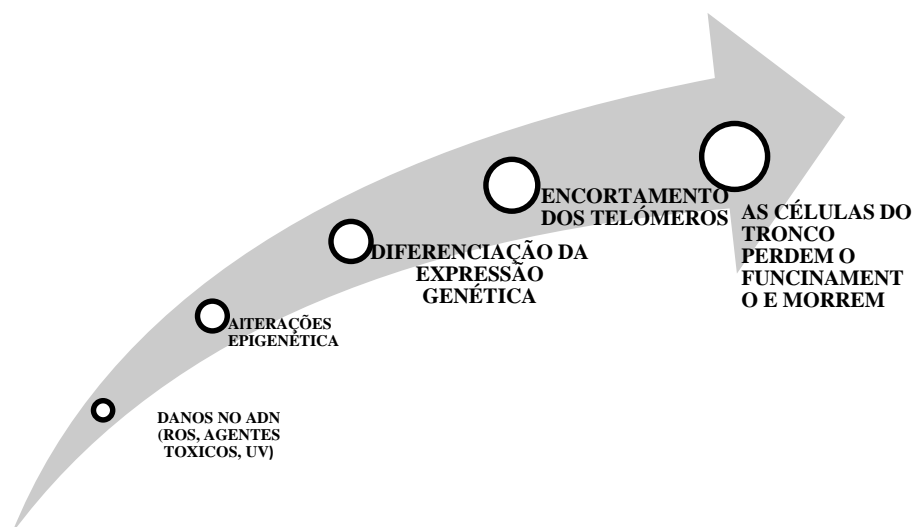


Figura 4. Alterações moleculares associadas ao processo de envelhecimento. Estas alterações não ocorrem necessariamente de forma sequencial, podendo ocorrer em simultâneo, e conduzem à acumulação sucessiva de alterações que, subsequentemente, origina o envelhecimento (Figura adaptada de Marques *et al.*, 2010).

As células que iniciam o processo de senescência perdem a capacidade de responder a estímulos mitogénicos, apresentam alterações a nível da estrutura da cromatina e da expressão génica e tornam-se volumosas e achatadas (Liu *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2010). Estas alterações podem ser observadas mediante a aplicação de metodologias adequadas, por exemplo a microscopia para a observação da morfologia da célula, métodos para a confirmação da expressão de padrões típicos de RNAs ou proteínas. Um marcador bioquímico de confirmação da senescência celular frequentemente utilizado *in vitro*, em ensaios citotóxicos, é a hidrólise do β -galactosídeo de um substrato cromogénico (X-gal) pela β -galactosidase lisossomal que se encontra sobreexpressa e acumulada em células senescentes. Esta atividade enzimática é frequentemente referida como SA- β -Gal (*senescent-associated β -galactosidase*) (Abdelmohsen e Gorospe, 2015; Debacq-Chainiaux *et al.*, 2009; Dimri *et al.*, 1995; Itahana *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2006). Outra característica típica da senescência é a secreção associada à senescência (SASP, *senescence-associated secretory phenotype*) que é caracterizada pela produção e secreção por parte de células senescentes de fatores solúveis de sinalização (principalmente as citocinas inflamatórias IL6 e IL8, e fatores de crescimento), proteases extracelulares

remoduladoras da matriz extracelular e outros componentes, tais como espécies reativas de oxigénio (ROS) e óxido nítrico (NO). É, por isso, importante a utilização de mais do que um método para estabelecer sem ambiguidade o fenótipo de senescência (Abdelmohsen e Gorospe, 2015; Liu *et al.*, 2012).

Vários estudos realizados na última década mostraram que a acumulação de células senescentes *in vivo* pode desencadear consequências positivas ou negativas. Em indivíduos jovens, a senescência é frequentemente considerada um mecanismo de supressão tumoral. Uma vez que as células senescentes não são capazes de reiniciar o ciclo celular, o processo de senescência é uma forma de impedir a propagação de células com alterações no DNA potencialmente oncogénicas. No entanto, células senescentes são também observadas no contexto de doenças associadas ao envelhecimento, tais como, cancro, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes e declínio da função imunológica. Nestes casos, a persistência de células com alterações potencialmente tumorais que não são eliminadas por apoptose ou pelo sistema imunológico poderão induzir alterações microambientais promotoras de cancro decorrentes da secreção de fatores oncogénicos ou fenótipos patológicos associados ao envelhecimento (Abdelmohsen e Gorospe, 2015). Por outro lado, também há a considerar o facto da remoção de células senescentes implicar divisão celular e/ou diferenciação por parte de outras células para a manutenção da integridade estrutural e funcional do respetivo tecido e este processo poder conduzir a alterações genómicas que, deste modo, aceleram o processo de senescência (Grillari e Grillari-Voglauer, 2010). Uma vez que o processo de senescência pode contribuir para o aparecimento de várias doenças crónicas associadas ao envelhecimento, estas doenças deverão partilhar características celulares e genéticas típicas de células senescentes (Jeyapalan e Sedivy, 2008).

Alguns dos principais fatores desencadeadores de senescência celular, quer intrínsecos quer extrínsecos são a seguir abordados.

4.2. *Stress* oxidativo e produção de ROS

Por definição, o *stress* oxidativo consiste num desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes a favor dos primeiros (Frei, 1999). A reação de um radical livre com outra molécula produz um radical livre diferente, que pode ser mais ou menos reativo do que a espécie original. Este processo tende a repetir-se continuamente terminando quando um radical reage com outro radical emparelhando os seus eletrões. Desta forma, se os primeiros radicais produzidos não forem inativados imediatamente por enzimas ou moléculas antioxidantes inicia-se o processo de danificação das macromoléculas biológicas. A acumulação destas moléculas, nas células e tecidos, tem tendência a aumentar com a idade devido a um aumento da produção/exposição de radicais livres, ou da diminuição da capacidade antioxidante e/ou da velocidade de remoção de radicais livres ou da reparação da molécula danificada, por exemplo o DNA (Barzilai *et al.*, 2002; Beckman e Ames, 1998).

A exposição a radiações ionizantes (raios gama, raios X e radiação ultravioleta de baixo comprimento de onda) aumenta as lesões oxidativas na molécula do DNA e está associada ao processo de envelhecimento causado por *stress* oxidativo (Finch, 1994; Wei *et al.*, 1998). Um tipo de lesão é a quebra de ligações fosfodiéster ou a dimerização de pirimidinas adjacentes do DNA. Estas mutações podem afetar negativamente a síntese e/ou a função de proteínas envolvidas na sinalização do DNA danificado ou em mecanismos de reparação do DNA, tais como a reparação por excisão de nucleotídeos, que, assim, deixam de atuar de forma eficaz condicionando a reversão dessas alterações (Finch, 1994; Vogel e Nivard, 2001). Mutações que afetam negativamente a estrutura/função destas proteínas têm sido especificamente implicadas no processo de envelhecimento prematuro (Grillari e Grillari-Voglauer, 2010).

Também as espécies reativas de oxigénio (ROS, *reactive oxygen species*), produzidas nas células em resultado da respiração mitocondrial, podem levar a alterações na molécula do DNA que têm sido associadas à senescência celular e a doenças relacionadas com o envelhecimento (Barja e Herrero, 2000; Esteve *et al.*, 1999). A oxidação das proteínas pode também ser um dos fatores responsáveis pela presença de proteínas anormais nos animais mais idosos (Finch, 1994).

4.3. Mutações na molécula de DNA

A diferente longevidade das espécies animais é, em parte, atribuída à sua constituição genética. Nesse sentido, a longevidade do animal dependerá do número de erros que ocorre durante a replicação do seu DNA celular e da capacidade em proceder à sua reparação, ou seja, o menor tempo de vida é consequência de uma maior acumulação de mutações nas células somáticas. Quando a acumulação de mutações nas células somáticas tem impacto negativo na fidelidade com que o material genético é copiado, a célula começa a envelhecer tornando-se progressivamente disfuncional. Os processos de manutenção da fidelidade da replicação do DNA são bastante eficazes, impedindo a acumulação de mutações. Em média, apenas ocorre um erro em cada 10⁵ ou em 10⁶ bases inseridas pela DNA polimerase, e quando a polimerase comete um erro na inserção das bases a replicação é interrompida para a correção desses erros através da função corretora da DNA polimerase. Contudo, estima-se que em cada 10³ a 10⁴ bases reparadas, uma base modificada escape a este tipo de reparação, ativando sistemas específicos de reparação do DNA. A permanência de erros na molécula de DNA pode dar origem à produção de proteínas mutadas, e a sucessiva acumulação dessas proteínas estruturalmente aberrantes e disfuncionais pode assumir proporções potencialmente letais e originar o aparecimento de fenótipos patológicos (Finch, 1994; Wood, 1996).

4.4. Encurtamento dos telómeros

Os telómeros (do grego *telos*, final, e *meros*, parte) são estruturas nucleoproteicas de comprimento variável, constituídas por longas extensões de repetições hexaméricas 5'-TTAGG-3' de cadeia dupla, não codificante, e por um complexo proteico específico designado por *shelterin*. A sua função é proteger as extremidades dos cromossomas da degradação prematura ou da fusão com outros cromossomas, regulação da síntese do DNA telomérico e regulação/manutenção do comprimento do telómero, prevenindo, assim, a instabilidade genómica e, consequentemente, as alterações da expressão génica associadas à senescência celular (Grillari e Grillari-Voglauer, 2010; Lemos, 2015).

A enzima responsável pela adição destas sequências repetitivas de DNA à extremidade 3' dos cromossomos é a telomerase ou RNA telomerase. Esta enzima é um complexo ribonucleoproteico constituído por uma parte proteica e por RNA. Da parte proteica faz parte a subunidade catalítica com atividade de transcriptase reversa e proteínas envolvidas na fixação da telomerase ao telómero ou na regulação da subunidade catalítica. O RNA representa a sequência molde para a síntese do DNA telomérico (Lemos, 2015; Zhou *et al.*, 2014)

Os telómeros de mamíferos são transcritos por ação da RNA polimerase II a partir de vários *loci* subteloméricos e as moléculas de RNA produzidas são constituídas por um número variável de repetições da sequência 5'-UUAGGG-3' (TERRA, *Telomeric repeat-containing RNA*). A sua associação ao telómero ocorre através da formação do segmento híbrido RNA-DNA ou da interação de ribonucleoproteínas específicas. Apesar da função deste transcripto ainda não estar completamente estabelecida, várias evidências sugerem a sua participação no processo de regulação do comprimento dos telómeros através de vários mecanismos: inibição da atividade da telomerase, ativação de exonucleases, regulação do nível de eucromatina e/ou atuação como fator de proteção (Lemos, 2015; Wang *et al.*, 2015).

Os telómeros, conjuntamente com a telomerase, permitem ultrapassar a limitação replicativa dos segmentos terminais de DNA que se verifica na maioria das células humanas somáticas. O encurtamento dos telómeros ocorre porque a maioria das células somáticas normais não sintetiza telomerase. Cada vez que a célula se divide, os telómeros são ligeiramente encurtados entre 50 e 201 pares de bases (bp) de DNA telomérico até atingir aproximadamente 4-7 bp. Como os telómeros não se regeneram, ao atingirem o comprimento crítico é comprometida a correta replicação dos cromossomos e a célula perde, completa ou parcialmente, a sua capacidade de divisão. Contudo, nas células cancerígenas a síntese de telomerase é ativada, o que poderá contribuir para a capacidade destas células sofrerem continuamente divisão celular (Itahana *et al.*, 2001; Mu e Wei, 2002).

Os telómeros desempenham um papel preponderante no envelhecimento tecidual uma vez que a perda progressiva da capacidade proliferativa das células ao longo da vida do

indivíduo implica o encurtamento progressivo dos telômeros. No entanto, nos tecidos constituídos por células pós-mitóticas, como as células do sistema nervoso e os cardiomiócitos, o processo de envelhecimento provavelmente resulta da acumulação de lesões celulares sucessivas induzidas por fatores de natureza química ou física, nomeadamente, o *stress* oxidativo. Nestes casos, a diminuição do número de células funcionais, quer por morte celular quer pela incapacidade de reparação dos danos, poderá determinar a funcionalidade dos respetivos órgãos, culminando eventualmente com a morte do indivíduo. Deste modo, o progressivo encurtamento dos telômeros constitui apenas um dos fenótipos da senescência e não a causa única do processo de senescência. (Wood, 1996).

5. Senescência celular e miRNAs

A descoberta de miRNAs revolucionou o conceito clássico de regulação da expressão génica e introduziu um novo grupo de moléculas que pode contribuir para as complexas mudanças observadas durante o envelhecimento. Desde a identificação, em *C. elegans*, de diversos miRNAs que influenciam a longevidade deste nematoide, numerosos estudos têm contribuído para a compreensão dos mecanismos de regulação do envelhecimento e de doenças relacionadas associadas a miRNAs. No caso dos mamíferos, este conhecimento não só é, ainda, limitado, como também mais complexo: o padrão de expressão de miRNAs varia ao longo do envelhecimento e exhibe especificidade tecidual e celular, e atuam não só sobre componentes de vias de sinalização convencionais do envelhecimento como também em vias de supressão tumoral, com funções naturalmente opostas nestes dois casos. Para além disso, na literatura existem discrepâncias relativamente ao nível de expressão de miRNAs (se sobreexpresso, subexpresso ou até ambos os casos) durante o envelhecimento e a nível da célula, tecido ou organismo. Estas discrepâncias sugerem que as alterações observadas dependem do tipo de miRNA e do contexto em que essas alterações ocorrem (Smith-Vikos e Slack, 2012). De salientar, ainda, que muitos dos mRNAs alvos de miRNAs promovem a longevidade enquanto que outros promovem o envelhecimento. Deste modo, é possível que os miRNAs, em geral, não tenham um efeito específico no envelhecimento, mas que a maior ou menor

progressão do envelhecimento, num contexto específico, seja determinado por miRNAs ou grupo de miRNAs específicos que, nesse contexto, são preferencialmente expressos (Smith-Vikos e Slack, 2012), ou seja, pelo balanço existente entre miRNAs com funções antagónicas. Todos estes aspetos dificultam a sistematização da informação global disponível sobre este assunto. No entanto, estão descritos mecanismos moleculares típicos da senescência replicativa e da senescência prematura que são, a seguir, descritos.

De facto, à medida que as células se aproximam da fase de senescência começam a expressar a proteína p53, resultante da expressão de um gene supressor tumoral, que interrompe o ciclo celular nas fases G1 e S. Esta proteína é particularmente importante no controlo do ciclo celular, sendo que a sua inativação ou mutação origina o aumento da proliferação celular, independentemente do comprimento dos telómeros. Em células em fase de senescência replicativa e em células em que o DNA foi lesado por ROS também foi observado um aumento da proteína p53 (Itahana *et al.*, 2001). Assim sendo, fatores estocásticos que induzam mutações nesta proteína poderão sobrepor-se aos mecanismos genéticos de controlo do processo de envelhecimento celular.

Na última década foram identificados e caracterizados vários miRNAs que participam na regulação de vias de sinalização implicadas na senescência celular. Essas vias de sinalização incluem, principalmente, as vias p53-p21-pRb e pRb-p16 que integram proteínas supressoras de tumores e, por isso, bloqueadoras do ciclo celular. A proteína retinoblastoma, pRb, inibida nestas duas vias de sinalização pelo aumento de p53-p21 ou p16-pRB, leva ao silenciamento da transcrição do fator de transcrição E2F, induzindo a paragem do ciclo celular e, eventualmente, apoptose (a sobreexpressão de E2F está associada à proliferação celular). No entanto, em células humanas, p53 também pode desencadear senescência celular independentemente de pRb; para além disso, o p16 individualmente também pode causar senescência celular. A maioria dos fatores indutores da senescência replicativa ou da senescência prematura, afetam, direta ou indiretamente, pelo menos uma destas vias clássicas de sinalização celular, p53/p21 e p16/pRb, que são os efetores finais do processo de senescência. Alguns exemplos de miRNAs associados a estas vias de sinalização da senescência celular (Figura 5) são o miR-34a que está sobreexpresso em virtude da ativação de p53 na senescência replicativa e na senescência prematura induzida pelo peróxido de hidrogénio, ou elementos da família de miR-106

cujas subexpressão ativa a proteína p21 na senescência induzida pelo *stress* (Abdelmohsen e Gorospe, 2015; Liu *et al.*, 2012).

Para além dos miRNAs que atuam através destas duas vias de sinalização principais, há outros miRNAs que estão envolvidos numa rede complexa de regulação do fenótipo de senescência celular e que altera aspetos funcionais específicos, tais como, a secreção associada à senescência (SASP), a proliferação e a adesão. Os fatores desencadeadores de SASP podem ser classificados em duas categorias principais: fatores solúveis de sinalização (principalmente citocinas inflamatórias IL6 e IL8, e fatores de crescimento), proteases extracelulares e outros componentes que são secretados tais como ROS e NO. Estes fatores concentram-se no espaço intercelular e podem afetar as células na proximidade através da ativação de recetores da superfície celular e respetivas vias de sinalização, podendo desencadear várias patologias, incluindo o cancro. Alguns exemplos de miRNAs são os miR-146a/b, que se encontram aumentados na senescência replicativa e na senescência induzida por agentes que danificam o DNA e que reprimem a expressão de citocinas inflamatórias, incluindo IL6 e IL8 (Figura 5) e o miR-217 que induz senescência endotelial associada ao aumento de NO (Abdelmohsen e Gorospe, 2015; Liu *et al.*, 2012).

Por último, é de referir que a simples deteção de alterações no nível da expressão de miRNAs durante o envelhecimento não implica diretamente esses miRNAs no processo de envelhecimento. Só os estudos funcionais decorrentes da supressão ou sobreexpressão de miRNAs permitem obter uma evidência direta e, deste modo, confirmar o seu papel regulador do processo de envelhecimento.

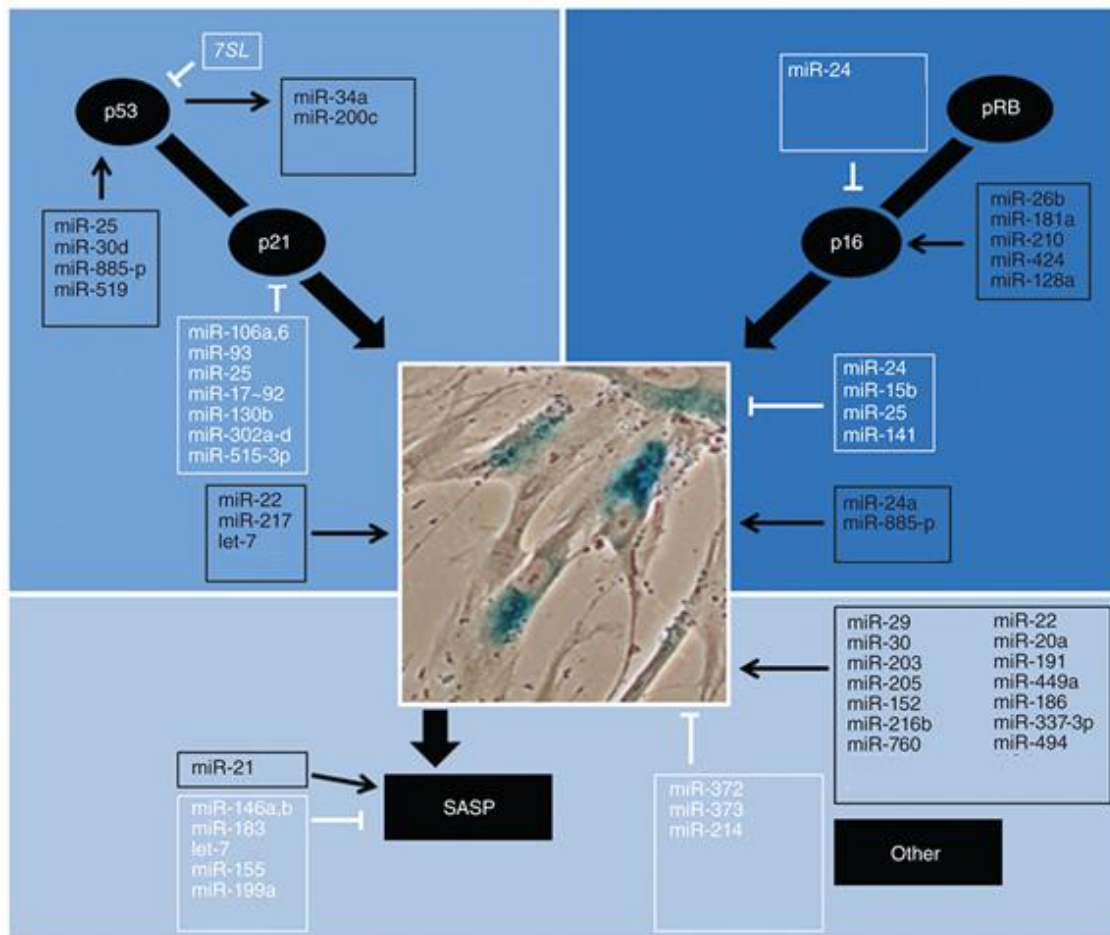


Figura 5. MicroRNAs promotores ou inibidores da senescência celular. Representação esquemática: os miRNAs que promovem a senescência celular estão indicados a preto, enquanto que os miRNAs inibidores estão indicados a branco. O painel superior esquerdo e superior direito referem-se às vias de sinalização p53-p21 e pRB-p16, enquanto que os painéis inferiores referem-se à via SASP ou a outras vias distintas. No centro da representação esquemática é mostrada uma imagem de fibroblastos senescentes em que a cor azul é indicativa do resultado positivo para SA-β-Galactosidase (Adaptada de Abdelmohsen e Gorospe, 2015).

6. Potencialidades terapêuticas dos miRNAs

As implicações terapêuticas dos miRNAs são referidas em diversos estudos sendo, por isso, de prever que estes pequenos RNAs não codificantes possam representar alvos terapêuticos importantes para doenças associadas à sobreexpressão de miRNAs. De facto, a utilização de anti-miRNAs, que são oligonucleótidos com modificações específicas (Figura 6), tem vindo a ser estudados para o tratamento de diversas patologias (Almeida *et al.*, 2011).

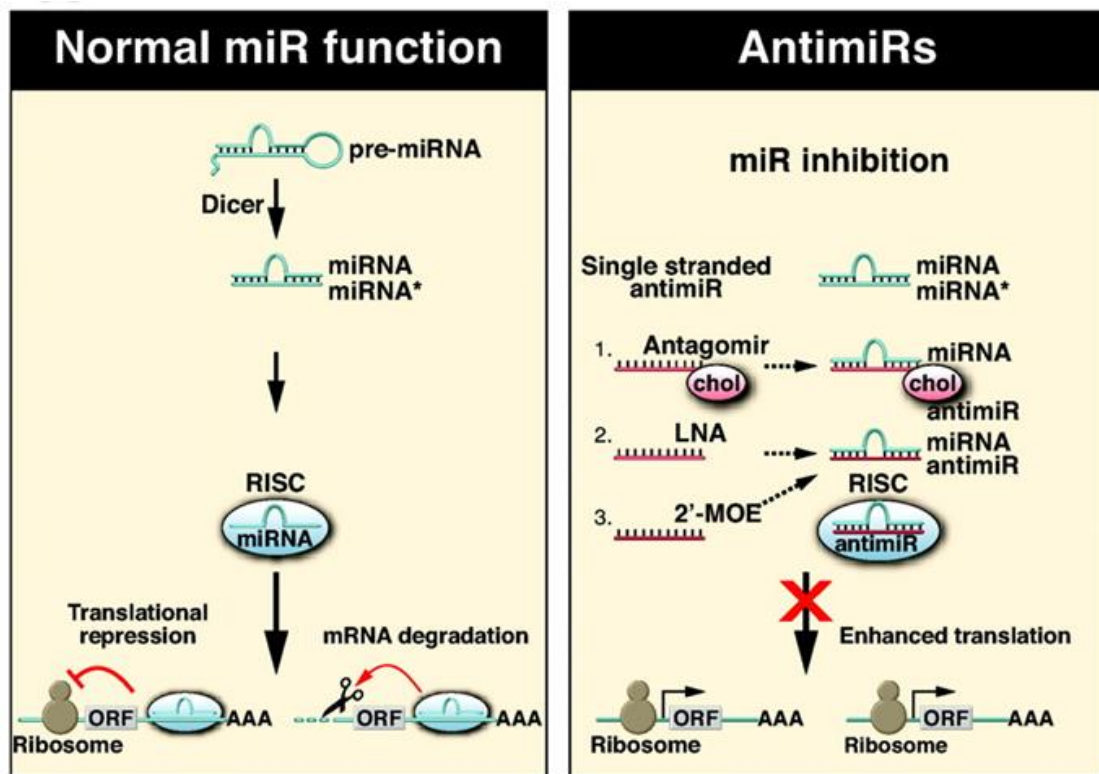


Figura 6. Tecnologias para a regulação da função de miRNAs *in vivo* baseadas em RNA interferente. Um miRNA é gerado a partir de pré-miRNA por Dicer, dando origem a uma cadeia dupla contendo um miRNA maduro e uma cadeia parcialmente complementares, designadas como miRNA *. Os anti-miRNAs são oligonucleotídeos *antisense* de cadeia simples que inibem a função do miRNA. A perfeita complementaridade da sequência permite que o oligonucleotídeo *antisense* se ligue ao miRNA interferindo com a sua função (indicado a vermelho) (van Rooij *et al.*, 2008).

Em 2004, Hutvágner *et al.* copiou com sucesso o fenótipo característico de uma mutação deletérica em *let-7* através da injeção de um oligonucleotídeo 2'-O-metilo complementar ao miRNA *let-7* em *C. elegans*. Em 2005, Krützfeldt e colaboradores utilizaram, pela primeira vez antagomirs, *in vivo*, que são uma classe de anti-miRNAs que estão conjugados com o colesterol para facilitar a ligação a proteínas séricas e a internalização e que podem ser utilizados para, por exemplo, bloquear oncomirs em doenças tumorais. Usando um modelo de ratinho, Krützfeldt e colaboradores, através de injeção intravenosa de anti-miRNAs para o miR-16, o miR-122, o miR-192 e miR-194 verificaram uma diminuição da atividade desses miRNAs. O silenciamento de miRNAs usando anti-miRNAs verificou-se por um período de tempo alargado e os efeitos do anti-miRNA para o miR-16 foram detetados em vários tecidos, exceto no cérebro, possivelmente devido à barreira sangue-cérebro. Adicionalmente a estas metodologias de inibição direta de miRNA, metodologias indiretas de inibição dos componentes da biogénese dos miRNAs, como por exemplo Dicer ou Drosha, também têm sido utilizadas. No entanto, esta inativação tem de ser cuidadosamente controlada uma vez que ela tem um efeito generalizado sobre todos os miRNAs (Almeida *et al.*, 2011).

Nas situações em que a subexpressão de miRNAs está associada à doença, por exemplo no caso de genes supressores de tumores, a abordagem terapêutica pode consistir no restabelecimento dos níveis dos miRNAs maduros na célula/tecido alvo(s). Nestes casos, poderão ser usados RNAs de cadeia dupla, sintéticos, semelhantes a moléculas de siRNA, que, por mimetizarem miRNAs de cadeia dupla, serão reconhecidos pelo complexo RISC e convertidos em miRNAs maduros de forma idêntica aos miRNAs. Esta abordagem ainda necessita de ser avaliada *in vivo* e melhorada, nomeadamente a nível das estratégias de estabilidade e complementaridade (Almeida *et al.*, 2011).

7. Os miRNAs como biomarcadores

Vários estudos têm demonstrado que, em contexto clínico, os miRNAs podem ser extremamente úteis no diagnóstico e no prognóstico de doenças, bem como na monitorização da resposta terapêutica.

Em 2004, Takamizawa e colaboradores perpetivaram, pela primeira vez, o valor prognóstico de miRNAs ao demonstrarem a diminuição da expressão de let-7 no cancro do pulmão bem como a sua associação a uma menor sobrevivência dos doentes. Desde então, vários estudos têm demonstrado a importância dos miRNAs a nível do diagnóstico e prognóstico em vários tipos de tumores.

O diagnóstico do cancro envolve, geralmente, a realização de um procedimento invasivo que consiste numa biópsia para obtenção da amostra biológica que será utilizada na confirmação/exclusão da doença. A presença de biomarcadores fiáveis em fluídos biológicos, como por exemplo o sangue, permitiria ultrapassar o desconforto que a realização de uma biópsia representa para o doente. De facto, ácidos nucleicos como miRNAs podem ser detetados em fluídos humanos, como o plasma/soro, urina ou saliva. Os miRNAs circulantes no plasma/soro, de origem endógena, são secretados dentro de micropartículas e exossomas (vesículas com 50-90 nm de diâmetro) o que evita a sua degradação e possibilita a sua utilização como marcadores. Além disso, a deteção de miRNA no soro é relativamente fácil devido à simplicidade do método de extração, à ausência de modificações adicionais decorrentes de etapas de processamento dos miRNAs e à elevada sensibilidade dos métodos utilizados na sua deteção, por exemplo o PCR (*polymerase-chain reaction*). A primeira publicação, em 2008, acerca da utilização dos miRNAs como ferramentas de diagnóstico em fluidos biológicos reporta a deteção de miRNAs placentários no plasma materno (Chim *et al.*, 2008). No mesmo ano, Lawrie e colaboradores, através da análise comparativa do soro de doentes com linfoma de células B com o soro de indivíduos saudáveis, demonstraram que os níveis de miR-155, miR-210 e miR-21 estavam sobreexpressos no soro dos doentes. Além disso, o nível de sobreexpressão de miR-21 observado no soro destes doentes estava correlacionado com o seu tempo de vida e as recidivas da doença (Lawrie *et al.*, 2008). Desde então, as alterações nos níveis de miRNAs têm sido descritas no soro de doentes com diferentes

tipos cancro, incluindo leucemia, linfoma, cancro gástrico, pancreático e colorectal, cancro oral, cancro da mama, ovário, próstata e pulmão, e cancros hepatocelulares (Almeida *et al.*, 2011).

Apesar da potencialidade dos miRNAs como biomarcadores no diagnóstico e prognóstico do envelhecimento e de doenças associadas ao envelhecimento, ainda é necessário padronizar as metodologias utilizadas nestes estudos a nível dos procedimentos de extração dos miRNAs do plasma, condições de armazenamento e métodos estatísticos para a análise de dados. Por outro lado, os estudos com a informação de dados clínicos detalhados para ambos os sexos e idades, são ainda são escassos (Almeida *et al.*, 2011). No entanto, estes biomarcadores representam ferramentas importantes para o estudo do envelhecimento e poderão ser eventualmente aplicados, no futuro, para monitorizar o efeito de terapias anti-envelhecimento e abordagens terapêuticas personalizadas (Marques *et al.*, 2010), ou até, eventualmente, em estudos preditivos do envelhecimento (Smith-Vikos e Slack, 2012). De facto, os padrões de expressão de alguns miRNAs em *C. elegans* são preditivos da longevidade deste organismo, bem como estudos recentes sugerem a correlação entre os níveis de miR-34a e miR-34c e o envelhecimento neuronal e a demência, respetivamente (Li *et al.*, 2011; Zovoilis *et al.*, 2011).

8. Conclusão e perspectivas futuras

O estudo do envelhecimento tem sido o objetivo de numerosos trabalhos de investigação publicados ao longo dos anos. Este processo complexo e irremediável associado à vida tem um especial interesse para a população humana devido à crescente incidência de patologias crónicas associadas à idade, incluindo a diabetes, a artrite, as doenças neurológicas, as doenças cardiovasculares e o cancro (Kirkwood, 2005). A compreensão adequada das bases moleculares do envelhecimento pode contribuir para prevenir ou atenuar a incidência destas patologias. Apesar do grande esforço que tem sido efetuado pela comunidade científica para desvendar os mecanismos que controlam o processo do envelhecimento, a natureza multifatorial deste processo tem dificultado a sua elucidação e caracterização. No entanto, há o consenso de que uma das características do envelhecimento é a acumulação progressiva de células danificadas e que esta acumulação compromete a homeostasia e a função do tecido (Ugalde *et al.*, 2011).

Ao longo dos últimos anos, diversos fatores foram identificados como sendo importantes para o processo de senescência celular, incluindo as reações oxidativas, o encurtamento dos telómeros e a diminuição progressiva da eficiência dos sistemas de reparação do DNA, entre outros. A nível molecular, a identificação de mutações genéticas que causam envelhecimento precoce em seres humanos e a caracterização de patologias associadas ao envelhecimento tem permitido a caracterização de vias celulares que influenciam a longevidade do organismo. Estas descobertas têm reforçado a importância das alterações no DNA no processo de senescência. De facto, a grande maioria dos fenótipos progeróides é causada por mutações em genes envolvidos na manutenção do genoma nuclear e na organização da cromatina. Mutações que afetem os sistemas de reparação do DNA, bem como genes envolvidos na sinalização de danos no DNA ou em genes codificantes para proteínas da lamina nuclear, deverão igualmente acelerar a senescência celular e, subsequentemente, o envelhecimento em seres humanos (Burtner e Kennedy, 2010; Kenyon, 2010).

A caracterização funcional de miRNAs, não só mudou substancialmente a visão clássica da regulação da expressão génica, como também revelou um novo grupo de moléculas que contribuem para o complexo processo da senescência e do envelhecimento e que

poderão representar alvos terapêuticos (Ugalde *et al.*, 2011). No entanto, o conhecimento atual acerca da função, regulação e potencial terapêutico dos miRNA no envelhecimento dos mamíferos é, ainda, relativamente limitado, não possibilitando a sua aplicação em contexto clínico (Ugalde *et al.*, 2011; Vijg e Campisi, 2008).

Em conclusão, a descoberta dos miRNAs foi um grande marco na história da ciência que veio acrescentar um novo nível de regulação do processo de expressão génica e, deste modo, ajudar a compreender de forma mais ampla as alterações moleculares que estão associadas a funções celulares básicas dos organismos eucarióticos. Apesar do conhecimento adquirido ao longo dos últimos anos, ainda existem muitas questões em aberto acerca da regulação dos miRNAs, na saúde e na doença. Por esse motivo, estudos adicionais serão necessários com vista a elucidar o contributo deste sistema de regulação pós-transcricional da expressão génica nos diferentes processos fisiológicos e patológicos dos organismos, nomeadamente na senescência, e proporcionar evidências para a aplicação desse conhecimento em ensaios pré-clínicos.

9. Bibliografia

Abdelmohsen, K., Gorospe, M. (2015). Noncoding RNA control of cellular senescence. *WIREs RNA*, 6: 615-629.

Almeida, M.I., Reis, R.M., Calin, G.A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications and new frontiers. *Mutation Research*, 717: 1-8.

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431(7006): 350-355.

Barja, G., Herrero, A. (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB J.*, 14: 312-318.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2): 281-297.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2): 215-233.

Barzilai, A., Rotman, G., Shiloh, Y. (2002). ATM deficiency and oxidative stress: a new dimension of defective response to DNA damage. *DNA Repair*, 1: 3-25.

Beckman, K.B., Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological Reviews*, 78 (2): 547-581.

Behm-Ansmant, I., Kashima, I., Rehwinkel, J., Saulière, J., Wittkopp, N., Izaurralde, E. (2007). mRNA quality control: An ancient machinery recognizes and degrades mRNAs with nonsense codons. *FEBS Letters*, 581(15): 2845-2853.

Bentwich, I., Avniel, A., Karou, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., Sharon, E., Spector, Y., Bentwich, Z. (2005). Identification of

hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.*, 37(7): 766–770.

Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E., Lai, E.C. (2007). Mammalian mirtron genes. *Mol. Cell*, 28(2): 328-336.

Burtner, C.R., Kennedy, B.K. (2010). Progeria syndromes and ageing: what is the connection? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 11: 567-578.

Debacq-Chainiaux, F., Erusalimsky, J.D., Campisi, J., Toussaint, O. (2009). Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cell in culture and in vivo. *Nature Protocols*, 4: 1798-1806.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E, Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(20): 9363-9367.

Esteve, J.M., Mompou, J., Garcia de la Asuncion, J., Sastre, J., Asensi, M., Boix, J., Vina, J.R., Vina, J., Pallardo, F.V. (1999). Oxidative damage to mitochondrial DNA and glutathione oxidation in apoptosis: studies in vivo and in vitro. *FASEB J.*, 13: 1055-1064.

Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Izaurralde, E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 9-22.

Fabian, M. R., Sonenberg, N., Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability. *Annu. Rev. Biochem.*, 79: 351-379.

Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Rev. Genet.*, 9: 102-114.

Finch, C. E. (1994). *Longevity, Senescence, and the Genome*. Chicago: University of Chicago Press.

Frei, B. (1999). Molecular and biological mechanisms of antioxidant action. *FASEB J.* 13: 963-964.

Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.*, 19(1): 92-105.

Grillari, J., Grillari-Voglauer, R. (2010). Novel modulators of senescence, aging, and longevity: small non-coding RNAs enter the stage. *Exp. Gerontology*, 45: 302-311.

Guo, H., Ingolia, N.T., Weissman, J.S., Bartel, D.P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466(7308): 835-840.

Hayflick, L. (1980). Recent advances in the biology of aging. *Mech. Ageing Devel.*, 14: 59-79.

Hayflick, L., Morhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains *Exp. Cell Res.*, 25: 585-621.

Hwang, H. W., Wentzel, E. A., Mendell, J. T. (2007). A hexanucleotide element directs microRNA precursors. *Science*, 315(5808): 95-98.

Itahana, K., Dimiri, G., Campisi, J. (2001). Regulation of cellular senescence by p53. *Eur. J. Biochem.*, 268: 2784-2791.

Itahana, K., Campisi, J., Dimri, G.P. (2007). Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol. Biol.*, 371: 21-31.

Jeyapalan, J. C., Sedivy, J. M. (2008). Cellular senescence and organismal aging. *Mech. Ageing Dev.*, 129: 467-474.

Kenyon, C. J. (2010). The genetics of ageing. *Nature*, 2010; 464: 504-512.

Kirkwood, T. B. (2005). Understanding the odd science of aging. *Cell*, 120: 437-447.

Koturbash, I., Zemp, F.j., Prokribny, I., Kovalchuk, O. (2011). Small molecules with big effects: the role of the microRNAome in cancer and carcinogenesis. *Mutat Res.*, 722 (2): 94-105.

Kozomara, A., Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.*, 42: D68-D73.

Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., Rajewsky, N. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*, 37(5): 495-500.

Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature*, 438(7068): 685-689.

Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulton, J., Wainscoat, J.S., Hatton, C.S., Harris, A.L. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.*, 141 (5): 672-675.

Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5(2): 187-195.

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rädmark, O., Kim, S., Kim, V.N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425 (6956): 415-419.

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.*, 23 (20): 4051-4060.

Lemos, C. A. R. C. (2015). Aspectos estruturais e funcionais do complexo telômero/telomerase. Tese. Mestrado integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M., Bartel, D.P., Burge, C.B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell*, 115(7): 787-798.

Lewis, B. P.; Burge, C. B. e Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1): 15-20.

Li, X., Khanna, A., Li, N., Wang, E. (2011). Circulatory miR34a as an RNAbased noninvasive biomarker for brain aging. *Aging*, 3: 985-1002.

Lim, L.P., Lau, N.C., Garret-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., Johnson, J.M. (2005). Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433(7027): 769-73.

Liu, F-J., Wen, T., Liu, L. (2012). MicroRNAs as a novel cellular senescence regulator. *Ageing Research Reviews*, 11: 41-50.

Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303(5654): 95-98.

Lytle, J. R., Yario, T. A., Steitz, J. A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104 (23): 9667-9672.

Marques, F.Z., Markus, M.A., Morris, B.T. (2010). The molecular basis of longevity, and clinical implications. *Maturitas*, 65: 87-91.

McGue, M., Vaupel, J.W., Holm, N., Harvad, B. (1993). Longevity is moderately heritable in a sample of Danish twins born 1870-1890. *J. Gerontology (Biol. Sci.)*, 48: B237- B244.

Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Rev. Genet*, 14: 447-459.

miRBase (<http://www.mirbase.org>) [Consultado em 20 de abril de 2016].

Moretti, F., Thermann, R., Hentze, M.W. (2010). Mechanism of translational regulation by miR-2 from sites in the 5' untranslated region or the open reading frame. *RNA*, 16(12): 2493-502.

Morozova, N., Zinovyev, A., Nonne, N., Pritchard, L.L., Gorban, A.N., Harel-Bellen, A. (2012). Kinetic signatures of microRNA modes of action. *RNA*, 18(9): 1635-1655.

Mota, M.P., Figueiredo, P.A., Duarte, J.A. (2004). Teorias biológicas do Envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciências do desporto*, 4(1): 81-110.

Mu, J., Wei, L. X. (2002). Telomere and telomerase in oncology. *Cell Research*, 12 (1): 1-7.

Rodriguez, A., Griffiths Jones, S., Ashurst, J.L., Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.*, 14(10A): 1902-1910.

Rose, M. R. (1991). *Evolutionary Biology of Aging*. Oxford: Editores Oxford University Press.

Rossi, J. J. (2005). RNAi and the P-body connection. *Nature Cell Biology*, 7: 643-644.

Sacco, L. D., Masotti, A. (2012). Recent Insights and Novel Bioinformatics Tools to Understand the Role of MicroRNAs Binding to 5' Untranslated Region. *Int. J. Mol. Sci.*, 14(1): 480-495.

Sevignani, C., Calin, G.A., Siracusa, L.D. (2006). Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. *Mamm. Genome*, 17(3): 189-202.

Sheth, U., Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 300(5620): 805-808.

Smith-Vikos, T., Slack, F. J. (2012). MicroRNAs and their role in aging. *J. Cell Science*, 125 (1): 7-17.

Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., Takahashi, T. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.*, 64 (11): 3753-3756.

Teixeira, I., Guariento, M. E. (2010). Biologia do envelhecimento: teorias, mecanismos e perspectivas. *Ciência & Saúde Coletiva*, 15 (6): 2845-2857.

Thomson, D.W., Bra (2011). Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res.*, 39 (16): 6845–6853.

Ugalde, A. P., Español, Y., López-Otín, C. (2011). Micromanaging aging with miRNAs- New messages from the nuclear envelope. *Nucleus*, 2(6): 549–555.

- Van der Oost, J. (2009). RNAi: Prokaryotes get in on the act. *Cell*, 139(5): 863-865.
- van Rooij, E., Marshall, W.S., Olson, E.N. (2008). Toward MicroRNA-Based Therapeutics for Heart Disease - The Sense in Antisense. *Circ. Res.*, 103: 919-928.
- Vasudevan, S., Tong, J. A., Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulated translation. *Science*, 318(5858): 1931-1934.
- Vijg, J., Campisi, J. (2008). Puzzles, promises and a cure for ageing. *Nature*, 454: 1065-1071.
- Vikos, T. S., Slack, F. J. (2012). MicroRNAs and their roles in aging. *J. Cell Sci.*, 125(1): 7-17.
- Vogel, E. W., Nivard, M. J. (2001). Phenotypes of *Drosophila* homologs of human XPF and XPG to chemically-induced DNA modifications. *Mutat. Res.*, 476: 149-165.
- Wang, C., Zhao, L., Lu, S. (2015). Role of TERRA in the Regulation of Telomere Length. *International Journal of Biological Sciences*, 11 (3): 316-323.
- Wei, H., Ca, Q., Rahn, R., Zhang, X., Wang, Y., Lebwohl, M. (1998). DNA structural integrity and base composition affect ultraviolet light-induced oxidation DNA damage. *Biochemistry*, 37: 6485-6490.
- Wood, R. D. (1996). DNA repair in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, 65: 135-167.
- Zhou, J., Ding, D., Wang, M., Cong, Y.S. (2014). Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression. *BMB*, 47(1): 8-14.
- Zovoilis, A., Agbemenyah, H.Y., Agis-Balboa, R.C., Stilling, R.M., Edbaner, D., Rao, P., Farinelli, L., Delalle, I., Schmitt, A., Falkai, P., Bahari-Javan, S., Burkhardt, S.,

Sananbenesi, F., Fisher, A. (2011). MicroRNA-34c is a novel target to treat dementias. *EMBO J.*, 30: 4299-4308.